Aus dem Städtischen Hygienischen Universitäts-Institut
zu Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. E. Küster)

Der Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER ZAHNÄRZTLICHEN
DOKTORWÜRDE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
ZU FRANKFURT AM MAIN

vorgelegt von

Erich Arabin
approb. Zahnarzt aus Frankfurt a. M.

im Mai 1936

Dissertationsdruckerei von F. W. Kalbfleisch in Gelnhausen.

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

Referent: Professor Dr. Küster.

Dekan: Professor Dr. Gaenßlen.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die überaus große Bedeutung, die dem direkten mikroskopischen Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum zur Erkennung einer offenen Lungentuberkulose zukommt, hat immer wieder Veranlassung gegeben, das Auffinden der Tuberkelbazillen im Präparat durch bessere und sicherere Methoden zu erleichtern.

Es gibt wohl für keine Bazillenart eine so große Anzahl von Nachweis-Verfahren, wie für den Tuberkelbazillus. Im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus und Uhlenhuth befindet sich eine Zusammenstellung von Poiré und Caranca, in der 61 Methoden aufgeführt sind.

Alle diese Verfahren gehen streng genommen auf die Methoden von Koch, Ehrlich, Ziehl und Neelsen zurück.

Eine Färbung der Tuberkelbazillen mit den gewöhnlich für den Bakterien-Nachweis angewandten Farblösungen gelingt nur sehr schwer, meistens überhaupt nicht. Erst Robert Koch konnte die Tuberkelbazillen entdecken, als er die mit schwach alkalischer Methylenblaulösung gefärbten Präparate mit konzentrierter wässriger Vesuvinlösung nachbehandelte. Das Vesuvin verdrängte das Methylenblau nur aus den anderen Bakterien; die Tuberkelbazillen dagegen blieben blau und hoben sich so gut von ihrer Umgebung ab. Einen wesentlichen Fortschritt erreichte Paul Ehrlich dadurch, daß er den Farben Anilin als Beize zusetzte, um dadurch das Eindringen der Farbstoffe in die Bakterienzelle zu beschleunigen.

Die Ziehl'sche Methode stellte eine weitere Vereinfachung durch die bessere Haltbarkeit der Farblösung dar. Die Anilinwasserfarben Paul Ehrlich's sind trotz des Alkoholzusatzes nur etwa 10 Tage haltbar. Ziehl verwandte Karbolsäure anstelle des Anilinwassers und erreichte so eine Steigerung des Färbevermögens des Methylvioletts. Neelsen führte das Karbolfuchsin ein, das heute noch von den meisten Untersuchern mit Vorliebe angewandt wird.

Die Ziehl-Neelsen'sche Methode der Färbung mit erhitzter Karbolfuchsinlösung, anschließendem Entfärben in 3%igem Salzsäurealkohol und Nachfärbung mit verdünnter Methylenblaulösung hat bis jetzt ihre beherrschende Stellung bei der Tuberkelbazillenfärbung behauptet, da die Farblösungen dauernd haltbar sind, und die intensiv rot gefärbten Bazillen auf dem blauen Untergrund gut zu sehen sind.

Von dieser klassischen Methode der Tuberkelbazillen-Färbung von Ehrlich, Ziehl, Neelsen sind im Laufe der Jahre die oben erwähnten 61 Verfahren abgeleitet worden.

Besondere Erwähnung verdient noch die Verwendung von Pikrinsäure, anstelle des Methylenblaues, zum Nachfärben.

Sind nun in einem Material nur spärlich Tuberkelbazillen vorhanden, so können, trotz größter Geduld und wiederholter genauester Untersuchung des Präparats, oft keine Tuberkelbazillen gefunden werden. Um nun in solchen Fällen den Nachweis zu erleichtern oder überhaupt erst zu ermöglichen, hat man nach Methoden gesucht, welche die Konzentration der Tuberkelbazillen auf eine möglichst geringe Menge von Untersuchungsmaterial bewirken.

Dieses Ziel erreichte man durch sogenannte Anreicherungsverfahren und zwar durch Homogenisierung des Sputums und nachfolgendes Ausschleudern in der Zentrifuge. Bei den so behandelten Sputa liegt natürlich eine Anreicherung im engen Wortsinn nicht vor. Im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus und Uhlenhuth hat L. Lange 96 Anreicherungsverfahren beschrieben. Bei den einzelnen Verfahren werden mehr oder weniger konzentrierte Alkalien oder chlorhaltige Präparate, besondere Lösungsmittel, wie Chloroform usw., oder auch Wärme zur Lösung des Schleims empfohlen.

Die aussichtsvollsten Verfahren sind natürlich solche, bei denen das Sputum, und zwar besonders ein Sputum von zäher, schleimiger Konsistenz, durch Auflösung der festen Bestandteile so verwandelt wird (homogenisiert), daß sich durch Zentrifugieren ein bazillenreicher Bodensatz gewinnen läßt.

Die beste, wohl auch am meisten angewandte Methode ist die Antiformin-Anreicherung von Uhlenhuth und Xylander.

Bei dem in der Zusammenstellung von L. Lange unter No. 82 beschriebenen Dold'schen Harnstoffverfahren sollen nach Corper und Uylei die Begleitbakterien nicht abgetötet werden. In einer kürzlich erschienenen Dissertation wird jedoch festgestellt, daß der Harnstoff sogar die Tuberkelbazillen abtötet.

Als Ersatz für das in dem Anreicherungsverfahren von Uhlenhuth und Xylander verwandte Antiformin (Natronlauge und unterchlorigsaures Natron) ist nach Rosenkranz und Seiger Natriumhypochloritlösung geeignet.

Die am Frankfurter Städt. Hygienischen Universitäts-Institut zur Anreicherung der Sputa verwandte Caporitlösung ist ein nach der Vorschrift von Gersbach selbst hergestelltes Antiformin:

„Zu 75 g Caporit (70%iges Chlorkalkpräparat I.G., Werk Griesheim) und 285 g Soda gibt man 2 Liter destilliertes Wasser, mischt und läßt absetzen".

Aus Caporit und Soda bildet sich Natriumhypochlorit neben $CaCO_3$ als Bodensatz und NaCl:

$$CaClOCl + Na_2CO_3 = NaOCl + NaCl + CaCO_3$$

Die überschüssige Soda liefert infolge hydrolytischer Spaltung NaOH, sodaß also im wesentlichen eine alkalische Natriumhypochloritlösung resultiert.

Antiformin tötet bei gutem Lösungsvermögen für das Sputum und bei Vernichtung der Begleitbakterien die Tuberkelbazillen nicht ab, und so

kann die Antiformin-Anreicherungs-Methode von Uhlenhuth und Xylander für Kulturverfahren verwandt werden.

Einen neuen Weg gehen v. Angerer und Eyer, die auf optischem Weg, und zwar durch Zuhilfenahme eines Lichtfilters, den Nachweis der Tuberkelbazillen verbessern wollen.

„Bekanntlich erkennt das menschliche Auge zwei farbige Gegenstände am leichtesten als verschiedenfarbig, wenn die Farbe der Gegenstände im komplementären Verhältnis zu einander stehen, wie dies etwa bei den Farbenpaaren rot-grün, gelb-violett und anderen Farbtönen der Fall ist.

Wenn man andererseits auf einer bunten Farbenkarte zwei bestimmte Farben, z. B. spektrales Grün und Rot besonders gut sichtbar machen will, dann erreicht man das, wie allgemein bekannt, am leichtesten dadurch, daß man die Farbenkarte mit kombiniertem spektralem Rot- und Grünlicht beleuchtet; alle Farben werden dann in einer Mißfarbe erscheinen, mit Ausnahme von Rot und Grün, die leuchtend und hell zur Darstellung gelangen. Aus diesen und ähnlichen Ueberlegungen heraus hatte K. v. Angerer bereits orientierende Versuche gemacht, die im Archiv für Hygiene veröffentlicht sind. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung von vor den Abbé-Kondensor eingeschalteten geeigneten Flüssigkeitsfiltern gelingt, die nach Ehrlich, Ziehl-Neelsen gefärbten Tuberkelbazillen als intensiv schwarze Gebilde auf grünlichem Untergrund oder als rot gefärbte Stäbchen auf blaugrünem Untergrund darzustellen. Als geeignete Filterflüssigkeiten hatten sich besonders die Lösungen von salzsaurem Kupfer, essigsaurem Nickel sowie von salpetersaurem Chrom bewährt.

Es fand sich in Uebereinstimmung mit Angaben des Schrifttums, daß die grünliche, leicht rotstichige Lösung des Chromnitrats nur überwiegend lichtdurchlässig war für den roten und grünen Spektralbezirk, allerdings unter bereits merklicher Dämpfung der Intensität des Gesamtspektrums; dermaßen gefiltertes Licht läßt Tuberkelbazillen in roter Farbe auf grünlichem Untergrund erscheinen.

Diese und ähnliche Erfahrungen haben nun v. Angerer und Eyer veranlaßt, nach weiteren Farbstoffen zu suchen, mit deren Hilfe es gelingen mußte, praktisch brauchbare Trockenfilter herzustellen.

Um zu klaren Vorstellungen von der Beschaffenheit der zu fordernden Filter zu gelangen, wurden die spektralen Eigenschaften der bei der Ehrlich, Ziehl-Neelsen-Färbung zur Verwendung kommenden Farbstoffe, des Fuchsins sowie des Methylenblaues, näher untersucht. Erstaunlicherweise ergab sich, daß beide Farbstoffe in ihrer Kombinierung zur Kontrastfärbung durchaus nicht so geeignet sind, wie dies auf den ersten Blick hin erscheinen mag. Das rote Fuchsin absorbiert, wie zu erwarten, den gesamten Bezirk von Grün bis hinein in das violette Spektralende, für das es wieder durchlässig ist. Das Methylenblau hingegen absorbiert außer im Gelb und Orange, wie zu verlangen, überdies noch einen beträchtlichen Teil des roten Spektrums. Das bedeutet aber, daß ein mit Fuchsin rot gefärbter Tuberkelbazillus in

mit Methylenblau gefärbte blaue Begleitmassen eingebettet, sich von diesen umso weniger in der Farbe unterscheiden wird, je dichter die blauen Begleitmassen sind, ein Umstand, der häufig genug erfüllt ist. Die Ursache liegt klar; das die blauen Begleitstoffe durchsetzende Licht verliert durch das absorbierende Methylenblau einen großen Teil seiner Rotquote; folglich ist der verbleibende Lichtrest so arm an Rot geworden, daß ein rot gefärbter Tuberkelbazillus so stark von Blau und Violett überstrahlt wird, daß er sich in seiner Farbe kaum vom Untergrund abheben und darum leicht übersehen werden kann. Es ist also der zur Gegenfärbung benutzte Farbstoff, der infolge seiner ungünstigen Absorptionseigenschaften zu an sich vermeidbaren diagnostischen Schwierigkeiten führen muß.

Es ist offensichtlich, daß der Farbenkontrast eines z. B. mit Malachitgrün gegengefärbten Ziehl-Neelsen-Präparates noch um ein Beträchtliches steigerungsfähig sein mußte, wenn man dafür Sorge trug, daß das Licht, welches das Präparat beleuchtet, bereits so verändert war, daß es nur diejenigen Spektralanteile enthielt, die den Farben des Präparates, nämlich Rot und Blaugrün, entsprachen. Es konnte durch Kombination eines Violettfilters bestimmter Dichte mit einem definiertem Gelbfilter eine sinngemäße Filterung des von einer 60 Watt Osramnitralampe gelieferten Lichtes erzielt werden.

Auf beigefarbenem Untergrund erscheinen die Tuberkelbazillen in auffallend leuchtender rubinroter Farbe, das Begleitmaterial in einem reinen Grün: stark verdeckt liegende Stäbchen sind zweifelsfrei als Rot zu erkennen und können nicht übersehen werden; während ihr Auffinden nach Entfernung des Filters auch geübten und bewährten Untersuchern Schwierigkeiten bereitet".

Auf Veranlassung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Küster, dem Direktor des Städt. Hygienischen Universitäts-Instituts zu Frankfurt a. M., habe ich nun eine große Anzahl von Sputa nach verschiedenen Methoden in Parallel-Versuchen untersucht, um so das brauchbarste Verfahren ermitteln zu können.

Als Untersuchungsmaterial wurden die laufend im Städt. Hygienischen Universitäts-Institut eingehenden Sputa verwandt. Von jedem Sputum wurden 4 Präparate hergestellt:

a) durch direktes Ausstreichen des Materials wurden zwei Originalpräparate angefertigt und zwar das eine nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen mit Methylenblau-Nachfärbung; das zweite ebenfalls nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, jedoch mit Pikrinsäure anstelle von Methylenblau.

1). Die Färbung nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen wurde wie folgt ausgeführt:

a) Die an der Luft getrockneten Präparate durch dreimaliges Durchziehen durch die nichtrauschende Flamme fixieren.
b) Färben mit konzentriertem Karbolfuchsin unter dreimaligem Erhitzen bis zur Dampfbildung.
c) Abspülen.

d) Einige Sekunden in 3%igem Salzsäure-Alkohol entfärben bis keine Farbe mehr abgeht.
e) Säure in Alkohol abspülen.
f) Nachfärben mit 10fach verdünnter Löffler'scher Methylenblaulösung 3—5 Sekunden.
g) Abspülen und Trocknen.

2). Die Färbung mit Pikrinsäure wurde nach der Vorschrift von Bender ausgeführt.

a) 2 Minuten färben mit konzentriertem Karbolfuchsin unter Erwärmung bis zum Bläschenspringen.
b) Entfärben in 3%igem Salzsäure-Alkohol und abwechselndes Waschen mit Wasser bis möglichst zum Verschwinden der Rotfärbung.
c) Färben mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung und Alkohol, 1 Minute lang.
d) Abspülen und Trocknen.

3). u. 4). Dasselbe Material wurde dann zur Anreicherung mit Caporitlösung 1:3 versetzt, gut vermischt und 24 Stunden stehen gelassen. Am folgenden Tag wurden dann gleiche Mengen des homogenisierten Sputums in zwei vorher austarierte Zentrifugengläser eingewogen. Das Material des einen Zentrifugenglases wurde mit zwei Teilen Alkohol auf einen Teil Material versetzt (aus wirtschaftlichen Gründen wird Brennspiritus verwandt). Durch Nachfüllen von Wasser in das andere Zentrifugenglas wurde wieder austariert. Beide Gläser wurden dann gleichzeitig in einer schnell laufenden Zentrifuge mit 3540 Umdrehungen pro Minute ausgeschleudert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Bodensatz auf je zwei Objektträger ausgestrichen.

Das Präparat der gewöhnlichen Caporit-(Antiformin)-Anreicherung und das der Caporit-Alkohol-Anreicherung wurden nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen gefärbt. Es kamen also von jedem Material immer vier verschiedene Präparate zur Untersuchung:

1. Ein Original-Präparat gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen;
2. Ein Original-Präparat gefärbt nach Bender;
3. Ein Präparat nach der Anreicherung mit Caporit, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen;
4. Ein Präparat nach Anreicherung mit Caporit-Alkohol, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen.

Ferner wurden alle nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen gefärbten Präparate noch mit einem Lichtfilter nach v. Angerer untersucht.

Auf diese Art wurde jedes Sputum nach 7 verschiedenen Methoden behandelt und untersucht.

1. Untersuchung des Originals, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen mit Lichtfilter.
2. Untersuchung des Originals, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, ohne Lichtfilter.
3. Untersuchung des Originals, gefärbt nach Bender, ohne Lichtfilter.

4. Untersuchung der Caporitanreicherung, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, mit Lichtfilter.
5. Untersuchung der Caporitanreicherung, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, ohne Lichtfilter.
6. Untersuchung der Caporit-Alkohol-Anreicherung, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, mit Lichtfilter.
7. Untersuchung der Caporit-Alkohol-Anreicherung, gefärbt nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, ohne Lichtfilter.

Bei den Tabellen I—V wurden die Zahlen- und Verhältniswerte auf folgende Weise gewonnen:

Jedes Präparat wurde bei der Untersuchung nach den 7 angeführten Methoden d r e i m a l untersucht und bestimmt, in dem wievielten Gesichtsfeld ein bzw. mehrere Tuberkelbazillen gefunden wurden, d. h. nach Durchsuchung von wieviel Gesichsfeldern das betreffende Präparat einwandfrei als positiv zu erkennen war.

So ergaben sich bei jeder Untersuchung drei Zahlen, deren Mittelwert dann als Vergleichszahl in eine Tabelle eingetragen wurde:

Dies sei an einem Beispiel erläutert:

Durch Untersuchung eines Präparates würden bei der

1. Durchsuchung im 6. Gesichtsfeld 2 Stäbchen;
2. „ „ 10. „ 3 „
3. „ „ 8. „ 2 „

gefunden.

$$6 + 10 + 8 = 24$$
$$24 : 3 = 8$$

Somit wurde das Präparat im 8. Gesichtsfeld als positiv erkannt (Durchschnitt). Der Wert 8 wurde nun in die Vergleichstabelle eingetragen.

Die Ermittlung der Vergleichszahlen für die Tabellen möchte ich an folgendem Beispiel erläutern:

Die Untersuchung eines Materials ergab folgende Werte:

1. Original mit Filter: 8,4,3 = 15
   15 : 3 = 5.
2. Original ohne Filter: 11,9,7 = 27
   27 : 3 = 9.
3. Anreicherung mit Caporit ohne Filter: 9,7,4 = 20
   20 : 3 = 6,6.

Es verhalten sich also:

$$\frac{\text{Original mit Filter}}{\text{Anreicherung mit Caporit}} = \frac{20}{15} = \frac{3}{4}$$

$$\frac{\text{Original mit Filter}}{\text{Original ohne Filter}} = \frac{15}{27} = \frac{5}{9}$$

$$\frac{\text{Anreicherung mit Caporit}}{\text{Original}} = \frac{20}{27}$$

Die Untersuchung des Originals mit Filter ergibt also die Verhältniszahlen 3 und 5, für die Caporitanreicherung 24. Da nun für eine Untersuchung zwei Werte vorhanden sind, ergäben sich beim Zusammenfassen in einer Tabelle durch das Beziehen auf einen Wert Brüche. Um dies zu vermeiden, und außerdem ein anschauliches, leicht zu übersehendes Zahlenmaterial zu erhalten, wurden die einzelnen Werte in verschiedene Tabellen eingetragen.

Es wurden gegenübergestellt:

Original ohne Filter: Pikrinsäure = O : P.

Original mit Filter: Orignal ohne Filter = $\frac{O}{F}$: O.

Anreicherung mit Filter: Anreicherung ohne Filter = $\frac{A}{F}$: A.

Anreicherung Caporit: Original = $\frac{A}{K}$: O.

Anreicherung Caporit-Alkohol: Original = $\frac{A}{S}$: O.

Die Verwendung eines Lichtfilters stellt also nach v. Angerer und Eyer eine Vereinfachung des mikroskopischen Tuberkelbazillen-Nachweises auf optischem Wege dar. Besonders, wenn vereinzelte Stäbchen verdeckt an dichten Stellen des Präparates liegen, oder auch wenn die Färbung nicht ganz einwandfrei ausgefallen ist, soll die Anwendung des Lichtfilters zum Auffinden der sonst für die Diagnosestellung verlorenen Tuberkelbazillen wertvolle Dienste leisten".

Durch einige orientierende Versuche in dieser Richtung wurden diese Angaben bestätigt:

Schwach positives Material wurde dick ausgestrichen, und ein Teil der Präparate normal, ein anderer Teil länger mit Löffler'scher Methylenblaulösung 1:10 nachgefärbt.

Bei den dick ausgestrichenen (3 Oesen) färbten sich bei der Nachfärbung die Sputumschichten so stark, daß die Tuberkelbazillen sehr schwer gefunden werden konnten, zum Teil sogar ganz der Beobachtung entgingen.

Unter Zuhilfenahme eines Filters konnten dann in allen Fällen Tuberkelbazillen, auch wenn sie vollständig verdeckt lagen, nachgewiesen werden.

Bei den länger mit 10fach verdünnter Löffler'scher Methylenblaulösung nachbehandelten Präparaten war das Auffinden der Stäbchen bei einfacher Untersuchung besonders durch die dunkelblauen Farbniederschläge noch schwieriger.

Durch Zuhilfenahme eines Filters wurden auch hier die meisten Präparate als positiv erkannt.

Auf Grund dieser Feststellungen wurden die für die einzelnen Versuchsreihen angefertigten Präparate dick ausgestrichen, denn bei einer größeren zur Untersuchung gelangenden Menge von Material steigt die Wahrscheinlichkeit, in diesem vorhandene Keime zu entdecken.

Um nun die Verbesserung, die durch Anwendung eines Filters erreicht wird, zu ermitteln, wurden 100 schwach positive Präparate in Sputa im direkten Ausstrich und im Anreicherungs-Präparat sowohl mit als auch ohne Filter untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen I und II zusammengefaßt.

Aus der Tabelle I geht hervor, daß man bei Untersuchungen ein und desselben Präparates bei Anwendung eines Filters 51,8% weniger Gesichtsfelder zu untersuchen braucht, um in gleichviel Gesichtsfeldern Tuberkelbazillen nachweisen zu können, als bei der Untersuchung ohne Filter; oder auch: bei der Untersuchung eines Originals mit Hilfe eines Filters werden bei der Durchsuchung von gleichviel Gesichtsfeldern 51,8% mehr Tuberkelbazillen (genauer 51,8% mehr Gesichtsfelder mit Tuberkelbazillen) gefunden.

Tabelle I.

$$\frac{\text{Original mit Filter}}{\text{Original ohne Filter}} = \frac{O}{F} : \frac{O}{O}$$

O : O	O : O	O : O	O : O	O : O
F	F	F	F	F
1 : 2	1 : 3	2 : 3	2 : 3	1 : 3
2 : 3	1 : 2	21 : 29	1 : 2	8 : 13
5 : 12	7 : 8	2 : 3	7 : 10	15 : 16
8 : 15	3 : 4	1 : 2	8 : 5	(82 : —)
6 : 13	1 : 2	11 : 17	4 : 7	(15 : 17)
14 : 19	3 : 5	14 : 19	3 : 5	14 : 15
(47 : —)	16 : 19	3 : 7	5 : 8	13 : 14
13 : 17	(62 : —)	4 : 7	7 : 9	1 : 3
9 : 15	15 : 17	5 : 8	4 : 7	9 : 11
13 : 17	3 : 7	4 : 7	5 : 6	8 : 11
15 : 19	1 : 3	5 : 6	1 : 2	(39 : —)
3 : 4	4 : 7	11 : 25	3 : 4	5 : 8
1 : 2	5 : 12	1 : 2	4 : 7	3 : 4
2 : 3	1 : 2	2 : 5	1 : 2	1 : 3
3 : 7	12 : 17	2 : 3	2 : 3	3 : 5
1 : 2	9 : 16	7 : 12	7 : 10	8 : 11
7 : 8	14 : 19	7 : 9	3 : 7	1 : 3
11 : 16	8 : 15	5 : 7	2 : 3	2 : 5
13 : 15	13 : 10	1 : 3	3 : 5	10 : 17
8 : 15	7 : 9	5 : 8	5 : 12	8 : 15
(31 : —)	2 : 3	1 : 2	7 : 12	2 : 3
135 : 204	126 : 188	114 : 184	81 : 133	127 : 177

135 : 204
126 : 188
114 : 184
81 : 133
127 : 177
583 : 886

Original mit Filter: Original ohne Filter = 583 : 886

$$\frac{100 \cdot (886-583)}{583} = \frac{100 \cdot 303}{583} = 51{,}974 = 51{,}8\%$$ d. h.:

durch Anwendung des Filters bei Originalpräparaten wird eine Verbesserung von 51,8% erreicht.

Tabelle II.

$$\frac{\text{Anreicherung mit Filter}}{\text{Anreicherung ohne Filter}} = \frac{A}{F} : \frac{A}{A}$$

A : A / F	A : A / F	A : A / F	A : A / F	A : A / F
2 : 3	2 : 3	17 : 23	5 : 8	1 : 2
7 : 10	7 : 11	3 : 4	2 : 3	15 : 21
14 : 15	(32 : —)	18 : 23	3 : 4	3 : 5
2 : 3	3 : 5	7 : 9	7 : 9	16 : 23
8 : 11	9 : 13	19 : 24	4 : 5	4 : 5
9 : 13	11 : 14	8 : 11	9 : 10	17 : 24
10 : 13	6 : 7	20 : 27	4 : 5	2 : 3
11 : 14	13 : 15	8 : 11	8 : 11	18 : 25
4 : 5	7 : 8	3 : 4	5 : 6	5 : 6
13 : 16	15 : 18	11 : 15	3 : 4	10 : 13
2 : 3	3 : 4	5 : 7	5 : 6	6 : 7
7 : 10	24 : 35	3 : 4	10 : 13	20 : 27
4 : 5	7 : 10	13 : 17	6 : 7	7 : 8
8 : 11	3 : 4	4 : 5	(56 : —)	11 : 14
3 : 4	8 : 11	15 : 17	6 : 7	7 : 8
3 : 4	6 : 7	4 : 5	13 : 16	23 : 28
11 : 15	11 : 13	11 : 24	7 : 9	24 : 29
3 : 4	13 : 16	23 : 28	2 : 3	4 : 5
15 : 17	7 : 9	4 : 5	7 : 9	25 : 29
8 : 9	14 : 19	24 : 25	14 : 19	9 : 14
144 : 185	169 : 222	120 : 278	120 : 154	227 : 296

144 : 185
169 : 222
120 : 278
120 : 154
227 : 296
880 : 1135

Anreicherung mit Filter : Anreicherung ohne Filter = 880 : 1135.

$$\frac{100 \cdot (1135-880)}{880} = \frac{100 \cdot 255}{880} = 28{,}977 = 29\%$$ d. h.:

Bei der Untersuchung der Anreicherungs-Präparate mit dem Filter ergibt sich eine Verbesserung von 29%.

Ferner wurden durch die Anwendung eines Filters 5% der Originalpräparate zusätzlich als positiv erkannt, bei denen also ohne Filter keine Tuberkelbazillen nachgewiesen werden konnten; d. h., bei der Untersuchung von Originalpräparaten mit einem Lichtfilter wird eine Verbesserung von 51,8% und eine Zunahme an positiven Befunden von 5% erreicht.

Durch die Zuhilfenahme eines Filters zur Untersuchung von Anreicherungs-Präparaten ergibt sich nur eine Verbesserung von 29%, und eine Zunahme der positiven Befunde um 2%. (Tabelle II)!

Die größere Verbesserung bei der Anwendung des Filters bei Originalpräparaten ist durch die Vernichtung der Begleitbakterien bei den Anreicherungsverfahren zu erklären. Bei den Anreicherungspräparaten kommt also eine Blauüberstrahlung sowie ein Verdecktwerden der Tuberkelbazillen nicht vor.

Zu der Verbesserung von 51,8% und einer Zunahme der positiven Befunde um 5% bei der Untersuchung der Originale mit einem Filter kommt noch hinzu, daß durch „die Abdämpfung des Lichtes durch das Filter die Ermüdung der Augen wesentlich hinausgezögert wird".

Bei der Färbung mit Pikrinsäure nach der Vorschrift von Bender kam ein Verdecktsein durch stark gefärbte Sputum-Schichten, wie z. B. bei der Nachfärbung mit Löffler's Methylenblau, kein einziges Mal vor. Oft jedoch waren manche Präparate trotz langen und guten Entfärbens noch rötlich gefärbt. In solchen Fällen war das Auffinden der Tuberkelbazillen auch bei stark positiven Präparaten sehr erschwert. Im allgemeinen waren jedoch die rotbraun gefärbten Stäbchen auf gelblichem Grunde gut zu sehen. Es fehlt allerdings der bei den Ehrlich-Ziehl-Neelsen-Präparaten so angenehme Farbkontrast, und so ermüdet das Auge trotz starken Abblendens beim Betrachten des im ganzen hellen Gesichtsfeldes recht schnell.

Aus der Tabelle III geht hervor, daß bei der Nachfärbung mit Pikrinsäure eine um 14,82 geringere Ausbeute gegenüber der Methylenblaunachfärbung vorhanden ist.

Die Nachfärbung eines Präparates mit Pikrinsäure wird man demnach im allgemeinen nicht ausführen, sondern eben nur für Farbenblinde anwenden.

Es ist dann aber auf gutes Entfärben, langes Nachfärben besonders auf das Abblenden zu achten.

Tabelle III.

$$\frac{\text{Original}}{\text{Pikrinsäure}} = \frac{O}{P}$$

O : P	O : P	O : P	O : P	O : P
6 : 7	3 : 4	6 : 7	2 : 3	2 : 3
4 : 5	2 : 3	9 : 11	5 : 6	4 : 5
8 : 9	11 : 12	7 : 8	7 : 8	7 : 7
7 : 8	4 : 5	15 : 16	4 : 5	3 : 4
11 : 12	7 : 9	8 : 9	23 : 26	5 : 6
9 : 11	9 : 11	13 : 15	1 : 3	8 : 9
6 : 7	15 : 16	8 : 9	4 : 5	7 : 8
13 : 17	13 : 14	11 : 13	11 : 13	4 : 5
10 : 11	14 : 15	13 : 15	4 : 5	11 : 13
7 : 8	12 : 13	12 : 14	10 : 11	4 : 5
6 : 7	3 : 4	5 : 6	16 : 19	25 : 26
9 : 10	5 : 6	7 : 8	8 : 9	7 : 8
8 : 9	13 : 14	8 : 9	20 : 23	3 : 4
6 : 7	8 : 9	9 : 10	17 : 21	4 : 5
9 : 10	7 : 8	8 : 9	3 : 4	17 : 22
7 : 8	14 : 17	13 : 14	6 : 7	8 : 11
8 : 9	14 : 15	10 : 11	5 : 6	10 : 13
16 : 17	12 : 13	12 : 13	18 : 21	4 : 5
10 : 13	9 : 10	7 : 8	19 : 22	11 : 14
15 : 16	11 : 12	14 : 17	6 : 7	9 : 10
175 : 201	186 : 210	195 : 212	189 : 224	152 : 183

175 : 201
186 : 210
195 : 212
189 : 224
152 : 183
897 : 1030

Original: Pikrinsäure = 897 : 1030 = (9 : 10).

$$\frac{100 \cdot (1030-897)}{897} = \frac{100 \cdot 133}{897} = 14{,}82\,\%$$ d. h.:

Die Färbung mit Pikrinsäure ist um 14,8% schlechter als die Färbung mit Methylenblau.

Bei Anwendung eines Lichtfilters für Pikrinsäure-Färbung wird man dann noch gegebenenfalls eine zusätzliche Verbesserung erreichen können.

Das Prinzip der Anreicherung ist wohl an den Tuberkelbazillen zum ersten Male zur Anwendung gekommen, und zwar im Jahre 1884 durch Unna an dem bekanntlich so bazillenarmen Lupusmaterial. Im Laufe der Zeit wurden dann noch zahlreiche Verfahren ausgearbeitet, von denen die Antiformin-Anreicherung nach Uhlenhuth und Xylander noch heute unübertroffen dasteht.

Hundeshagen empfiehlt in seiner Modifikation der Antiformin-Methode (1919), „wenn die zur Verfügung stehende Zentrifuge nicht genügend Umdrehungen macht (Handzentrifuge), einen Zusatz von zwei Teilen Alkohol auf einen Teil Material und 5 Minuten langes Ausschleudern anstelle des sonst in seiner Vorschrift vorgesehenen Zentrifugierens von ½—1 Stunde nach Wasserzusatz.

Schon im Jahre 1903 hatte Dilg von dem Prinzip der Veränderung des spezifischen Gewichtes bei der Tuberkelbazillen-Anreicherung Gebrauch gemacht. Allerdings erhöhte er dasselbe durch Zusatz von NH_3 und NaCl und entnahm dementsprechend das auszustreichende Material nach dem Ausschleudern aus den oberen Schichten.

Bei dem Antiformin-Anreicherungsverfahren nach Uhlenhuth und Xylander in der Modifikation von Hundeshagen (hier kurz Caporit-Alkohol-Anreicherung genannt) wird durch den Alkoholzusatz das spezifische Gewicht des zum Ausschleudern gelangenden Materials herabgesetzt. Die Differenz der spezifischen Gewichte der zu trennenden Tuberkelbazillen und des Sputums ist dadurch größer geworden. Hierdurch und infolge der Herabsetzung der inneren Reibung gelangen die Tuberkelbazillen besser ins Sediment. In diesem bazillenreicheren Bodensatz können entsprechend mehr Bazillen nachgewiesen werden.

Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes von 30 Sputa ergab folgende Werte:

1,052	1,007	1,010
1,003	1,041	1,049
1,045	1,063	1,004
1,011	1,008	1,053
1,004	1,055	1,046
1,007	1,010	1,005
1,005	1,005	1,008
1,042	1,071	1,007
1,006	1,004	1,009
1,023	1,043	1,028
10,198	10,307	10,219
	10,198	
	10,307	
	10,219	
	30,724	

30,724 : 30 = 1,02413.

Das durchschnittliche spezifische Gewicht für Sputum beträgt demnach: 1,024.

Bei einem Zusatz von zwei Teilen Caporit vom spezifischen Gewicht 1,02 auf einen Teil Material ergibt sich ein spezifisches Gewicht von 1,021 für das Gemisch:

1,024
1,02
1,02
3,064

3,064 : 3 = 1,0213 = 1,021.

Durch den Zusatz von a) 2 Teilen Alkohol mit dem spezifischen Gewicht von 0,8 bzw. b) 2 Teilen destillierten Wassers auf 1 Teil Material ergeben sich folgende spezifische Gewichte für die zum Ausschleudern gelangenden Materialien:

a) Alkohol:	b) Aqua destillata:
1,021 (3)	1,021 (3)
0,8	1,00
0,8	1,00
S. = 2,621 (3)	S. = 3,021 (3)
2,621 : 3 = 0,874	3,021 : 3 = 1,007

Die durch den Alkoholzusatz erreichte Differenz bzw. Herabsetzung des spezifischen Gewichtes beträgt: 0,133 mg, d. s. 13,2%

1,007
0,874
0,133

In der Literatur ist das spezifische Gewicht der Tuberkelbazillen mit 0,887—1,060 angegeben.

Bei einem spezifischen Gewicht von 1,007 des zum Ausschleudern gelangenden Materials (gewöhnliche Caporit-Anreicherung) gingen nur die Tuberkelbazillen mit einem spezifischen Gewicht von 1,008 bis 1,06 — d. s. 31,4% — ins Sediment.

Durch die Herabsetzung des spezifischen Gewichtes infolge des Alkoholzusatzes auf 0,873 müßten alle Tuberkelbazillen — 100% — durch das Ausschleudern in den Bodensatz gelangen können.

Die einzelnen Autoren bringen verschiedene, zum Teil sehr hohe, Prozentzahlen (bis zu 50%) für die allein aufgrund der Anreicherung erzielte Zunahme an positiven Befunden.

Um nun festzustellen, wie groß die Vorteile eines ausgeführten Anreicherungsverfahrens sind, wurden von mir 100 schwach positive Sputa untersucht.

Die Untersuchung dieser 100 schwach positiven Sputa geschah auf folgende Weise:

Von jedem Material wurden 3 Ehrlich-Ziehl-Neelsen-Präparate und zwar ein Original, eine Caporit-Anreicherung und eine Caporit-Alkohol-Anreicherung angefertigt.

Die Werte der einzelnen Untersuchungen (Tabelle 4 und 5) wurden in zwei Tabellen eingetragen. In der einen wurden Original- und Caporit-Anreicherung (Tabelle IV), in der anderen Original und Caporit-Alkohol-Anreicherung (Tabelle V) gegenübergestellt.

Die in den Tabellen IV und V zusammengestellten Durchschnittszahlen ergeben eine Verbesserung von 6,4% durch die Caporit-Anreicherung und eine Verbesserung von 13,31% durch die Caporit-Alkohol-Anreicherung.

Ferner ist eine Zunahme an positiven Befunden von 4% bei der Caporit- und eine von 7% bei der Caporit-Alkohol-Anreicherung aus den Tabellen ersichtlich.

Demgegenüber stehen aber auch 4% bzw. 5% der Fälle, bei denen bei positivem Befund im Original in der Anreicherung keine Tuberkelbazillen nachgewiesen werden konnten.

In Uebereinstimmung mit obigen Ergebnissen stehen die Sputum-Untersuchungs-Befunde des Hygienischen Instituts zu Frankfurt a. M. (1. VII. 1934 bis 2. II. 1936).

Von 3158 eingesandten Sputa waren 559, d. s. 17,7%, positiv.

Von diesen 559 positiven Befunden wurden 310, d. s. 57%, einwandfrei im Original als positiv erkannt. 205, d. s. 35%, wurden, aus der ausgeführten Anreicherung zu schließen, nicht einwandfrei als positiv erkannt.

Tabelle IV.

Original	Anreicherung mit Caporit		A E = O	
A : O C	A : O C	A : O C	A : O C	A : O C
8 : 9	37 : 38	(— : 38)	20 : 21	45 : 47
12 : 13	23 : 24	13 : 14	21 : 22	20 : 21
30 : 31	21 : 22	18 : 19	24 : 35	(43 : —)
7 : 8	16 : 17	14 : 15	16 : 17	(— : 47)
28 : 29	15 : 16	16 : 17	25 : 26	51 : 53
8 : 9	19 : 20	46 : 48	23 : 24	31 : 32
10 : 11	23 : 24	(54 : —)	47 : 49	29 : 30
12 : 13	25 : 26	(37 : 39)	22 : 23	21 : 22
(22 : —)	(— : 56)	22 : 23	20 : 21	25 : 26
26 : 27	18 : 19	30 : 31	24 : 25	21 : 22
22 : 23	20 : 21	43 : 45	19 : 20	49 : 51
24 : 25	17 : 18	19 : 20	23 : 24	23 : 24
16 : 17	27 : 28	28 : 29	41 : 43	24 : 25
18 : 19	31 : 32	20 : 21	19 : 20	28 : 29
14 : 15	21 : 22	11 : 22	22 : 23	22 : 23
(— : 81)	(39 : —)	39 : 41	(— : 41)	27 : 28
30 : 31	33 : 34	41 : 43	45 : 47	47 : 49
24 : 35	22 : 23	22 : 23	21 : 22	41 : 44
22 : 23	24 : 25	26 : 27	17 : 18	24 : 25
25 : 26	42 : 45	23 : 26	26 : 27	49 : 52
330 : 354	434 : 483	408 : 503	475 : 497	577 : 603

336	354
434	483
468	503
475	497
577	603
2290	2440

Anreicherung mit Caporit: Original = 2290 : 2440 = 11 : 12.

$\frac{100 \cdot (2440-2290)}{2290} = \frac{100 \cdot 150}{2290} = 6{,}40\%$ d. h.:

Durch die Anreicherung mit Caporit wird gegenüber dem Original eine Verbesserung von 6,4% erreicht.

Tabelle V.

Anreicherung mit Spiritus

Original A : O				A : O				A : O				A : O				A : O			
S				S				S				= A : O				S			
4	5			14	15			7	8			8	11			4	5		
7	8			8	9			24	27			8	9			13	14		
6	7			13	14			13	14			11	12			7	8		
16	21			(—	51)			(28	—)			(37	—)			8	9		
8	9			28	29			8	9			7	8			(14	—)		
7	9			29	31			4	5			7	9			8	9		
(—	67)			10	11			13	14			13	14			29	31		
9	10			14	15			14	16			15	16			26	29		
14	15			3	4			6	7			11	12			10	11		
11	12			(—	58)			(—	39)			3	4			24	25		
13	14			3	7			3	4			11	12			14	15		
10	11			1	2			7	8			6	7			(—	43)		
(—	54)			14	19			8	9			10	11			18	19		
2	3			3	4			12	13			6	7			8	9		
6	7			4	5			9	10			10	11			16	19		
18	19			16	21			9	11			7	8			13	15		
8	9			9	11			8	9			(—	35)			14	17		
7	8			6	7			(57	—)			8	9			7	8		
(26	—)			2	3			14	15			7	8			4	5		
11	12			4	5			10	11			9	10			13	14		
157	179			182	212			169	190			157	178			236	262		

157	179
182	212
169	190
157	178
236	262
901	1021

Anreicherung mit Spiritus : Original = 901 : 1021 = 9 : 10.

$\frac{100 \cdot (1021-901)}{901} = \frac{100 \cdot 120}{901} = 13{,}31\%$ d. h.:

Durch die Anreicherung mit Caporit und Spiritus ist eine Verbesserung der Ausbeute gegenüber dem Original von 13,3% erreicht worden.

Durch die ausgeführte Anreicherung wurden weitere 44 Sputa (7,87%), deren Untersuchung im Original negativ war, zusätzlich als positiv erkannt.

Andererseits fielen bei 23 Präparaten (4,14%), die schon im Original als positiv erkannt waren, die Anreicherungen negativ aus.

Originale:	Anreicherungen	Eigene Versuche:	Instituts-Ergebnisse:
negativ.	positiv.	5,5%	7,87%
positiv.	negativ.	4,5%	4,14%

Die von den einzelnen Autoren zusätzlich durch die Anreicherung erreichten hohen Zunahmen an positiven Befunden (50%) (in obiger Vergleichstabelle nur 2,37%) ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, daß „diese in allzu großem Vertrauen auf ihre Anreicherungs-Verfahren die Untersuchung der Original-Präparate nicht mit genügender Sorgfalt vorgenommen haben.

Ferner haften allen Anreicherungs-Verfahren große Gefahren an: Das die Anreicherung ausführende Personal ist einer verhältnismäßig großen Infektionsgefahr ausgesetzt. Bei den einzelnen Arbeitsgängen, besonders beim Hantieren mit Zentrifugen-Gläsern, kann Material verspritzt und so zu einer Infektionsquelle werden. Ferner können in das Untersuchungsmaterial fremde säurefeste Stäbchen hineingelangen. Es ist festgestellt worden, (Helmes, Dold, Pröscholdt usf.) daß häufig in altem destilliertem Wasser an Wasserleitungshähnen, säurefeste Stäbchen zu finden sind. Aus diesem Grunde sind die Wasserleitungshähne von Zeit zu Zeit zu säubern, „und das verwandte destillierte Wasser mindestens eine Stunde abzukochen" (Pröscholdt), um die Fehlerquelle durch die oben erwähnten säurefesten Stäbchen auszuschalten.

Da die Tuberkelbazillen ihre Färbbarkeit nach Einwirkungen verschiedenster Art noch behalten, ist die gründliche Reinigung aller benutzten Gegenstände (Spritz- und Zentrifugengläser usf.) am besten in konzentrierter Schwefelsäure unbedingt notwendig.

Bedenkt man nun die umständliche und vor allem die zeitraubende Arbeit, die die Ausführung eines Anreicherungs-Verfahrens beansprucht, zieht ferner die ihr anhaftenden Gefahren und Fehlerquellen in Betracht, so muß man zugeben, daß die große Bedeutung, die einzelne Autoren ihr zuschreiben, nicht berechtigt ist. Von verschiedener Seite (Kössel, Engelsmann, Matson, v. Hoeslin, Poiré usf.) wird ebenfalls der Wert der Anreicherungs-Methoden für die Sputum-Untersuchungen nur sehr bedingt eingeschätzt.

Nach Kössel kann z. B. „eine sorgfältige, wiederholte Untersuchung des Auswurfs verdächtiger Kranker im direkten Ausstrichpräparat trotz aller Fortschritte in der Anreicherungstechnik nicht warm genug empfohlen werden".

Es läßt sich — richtige Anwendung eines erprobten Verfahrens z. B. Caporit-Alkohol-Anreicherungs-Verfahren vorausgesetzt — nicht abstreiten, daß, bei der Anreicherung von oben beschriebenen Fehlern und Nachteilen abgesehen, eine größere Menge von Material zur Untersuchung kommt. Es handelt sich, wie schon gesagt, nicht um eine aktive Anreicherung (wie z. B. Züchtung auf einem Nährboden), „sondern nur um eine räumliche Einengung, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, in dem zur mikroskopischen (oder kulturellen) Untersuchung gelangenden Material Tuberkelbazillen aufzufinden bzw. auf den Nährboden zu bringen".

Wenn man aber nun noch die Feststellung hinzunimmt, daß die Anreicherung in fast ebensoviel Fällen versagt, als durch sie ein im Original negatives Material als positiv erkannt wurde, so geht man nicht zu weit, wenn man versucht, ohne Anreicherung auszukommen, zumal die Untersuchung des direkten Ausstrichs durch Zuhilfenahme eines Lichtfilters wesentlich erleichtert ist und fast immer zum Ziele führt.

Literatur

Kolle, Kraus, Uhlenhuth:

Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl., Band V, 2, S. 635.
„ IX, „ 447—760.
„ X, „ 43.
„ X, „ 334—348.

Rooschütz, Hans:

„Abtötung der Tuberkelbazillen als erwünschte Nebenwirkung bei der Tuberkelbazillenanreicherung nach Dold". Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Band 117, Heft 4, 1935.

v. Angerer und Eyer: „Ein Lichtfilter zum erleichterten Auffinden der nach Ziehl-Neelsen gefärbten Tuberkelbazillen". Münch. med. Wochenschr. 82. Jahrg., No. 9, S. 348.

Zusammenfassung

Das beste der zahlreichen Verfahren zum „Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum" ist die Untersuchung des Originalpräparates unter Zuhilfenahme eines Lichtfilters.

Die geringe Verbesserung, die durch die Ausführung eines Anreicherungsverfahrens erreicht wird, die mühevolle und zeitraubende Arbeit, die vielen Fehlerquellen und vor allem die vergrößerte Infektionsgefahr für das Personal führen zu der Erkenntnis, daß es sich nicht lohnt, von einem verdächtigen Untersuchungsmaterial Anreicherungspräparate herzustellen.

Verwendet man zusätzlich noch einen Teil der sonst für die Anreicherung verwandten Zeit zur sorgfältigen Durchmusterung der Originalpräparate unter Zuhilfenahme eines Lichtfilters nach v. Angerer, so wird man wohl immer schneller und müheloser zum Ziele kommen.

Zum Schluß möchte ich nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. E. Küster für die Ueberlassung des Themas und die Förderung bei der Ausführung desselben sowie für die Uebernahme des Referates meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 21. April 1913 wurde ich als Sohn des Oberpostinspektors Konrad Arabin zu Frankfurt a. M. geboren. In meinem 6. Lebensjahre wurde ich in die hiesige Frauenhofschule eingeschult. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule trat ich in die Sexta der Sachsenhäuser Oberrealschule ein, an der ich Ostern 1932 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer-Semester 1932 begann ich mein Studium der Zahnheilkunde an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

Die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich am 28. II. 1934 mit „gut" und am 28. November 1935 vor dem Prüfungsausschuß zu Frankfurt a. M. das zahnärztliche Staatsexamen mit dem Gesamturteil „gut".

Zurzeit bin ich als Assistent in meinem Beruf tätig.

Erich Arabin.